

УДК 517.15

## СТРУКТУРА ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНОГО КОМПЛЕКСА ПРИ ГИДРОЛИЗЕ ГУАНОЗИНТРИФОСФАТА ФАКТОРОМ РОСТА EF-Tu: СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КВАНТОВОЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

М.С. Шадрина, Б.Л. Григоренко, А.В. Немухин

*(кафедра физической химии; e-mail: anemukhin@yahoo.com)*

Приведены результаты расчетов равновесной геометрической конфигурации фермент-субстратного комплекса для гидролиза гуанозинтрифосфата белком EF-Tu, выполненных двумя теоретическими подходами: комбинированным методом квантовой механики – молекулярной механики (КМ/ММ) и методом молекулярной динамики. Показано, что геометрическая конфигурация реакционного комплекса, определенная методом КМ/ММ, согласуется с представлениями о механизме реакции гидролиза, в то время как в структуре фермент-субстратного комплекса, предсказанной методом молекулярной динамики с силовым полем CHARMM, относительное положение нуклеофильного реагента (молекулы воды) и основания (боковой цепи гистидина) не отвечает оптимальному расположению реагентов.

Исследование механизмов реакций ферментативного катализа, включая стадии элементарных химических превращений в активных центрах белковых систем, необходимо для получения знаний о функционировании клеток живых организмов, для решения практических задач фармацевтики и биотехнологии [1]. Результаты экспериментальных методов, применяемых для изучения ферментативных реакций, включая традиционные кинетические исследования, часто в сочетании с приемами генной инженерии, а также исследования методами рентгено-структурного анализа комплексов ферментов с аналогами субстратов или ингибиторами, предоставляют важнейшую информацию о механизмах сложных превращений в белках. Результаты компьютерных расчетов на основе современных методов молекулярного моделирования, а именно молекулярной механики (ММ), молекулярной динамики (МД), квантовой химии и комбинированных подходов квантовой механики – молекулярной механики (КМ/ММ), позволяют существенно дополнить экспериментальные исследования, добавить новую информацию и обеспечить визуализацию процессов ферментативного катализа с атомным разрешением.

Методы ММ и МД, основанные на использовании эмпирических или полуэмпирических силовых полей для описания потенциалов взаимодействия атомов, представляют наиболее востребованные в настоящее время инструменты для моделирования биомолекулярных систем, поскольку их применение оказывается

практически возможным для компьютерных расчетов структур с сотнями и тысячами атомов. Параметры силовых полей десятилетиями подбирались и уточнялись по экспериментальным данным, а в последние годы и по данным квантовохимических расчетов, но тем не менее вопрос о надежности результатов моделирования биомолекул с силовыми полями постоянно дискутируется в литературе. Бесспорно, что при описании химических реакций, т.е. при описании разрыва и образования химических связей, преимущество имеют методы, основанные на квантовых уравнениях для потенциалов взаимодействия. Однако и в тех задачах, где рассматриваются структурные аспекты биомолекул, при использовании эмпирических силовых полей могут возникать сложности.

В данном сообщении обсуждается структура фермент-субстратного комплекса одной из важнейших систем ферментативного катализа – белка фактора роста EF-Tu в конфигурации комплекса EF-Tu-рибосома с гуанозинтрифосфатом (ГТФ), определенная как методом КМ/ММ, так и по результатам МД-моделирования с силовым полем CHARMM.

Фактор роста EF-Tu играет важную роль в биосинтезе белков, причем составной частью процесса является быстрый гидролиз ГТФ до гуанозиндифосфата и неорганического фосфата в тройном комплексе EF-Tu•ГТФ•рибосома. По результатам кинетических исследований известно, что критической аминокислотой фермента является His85 [2]. Для теорети-

ческого исследования реакции гидролиза ГТФ была построена модель на основе кристаллической структуры белка EF-Tu с аналогом ГТФ (код 1EFT в банке данных белковых структур). Модель содержит непротонированную молекулу ГТФ, 210 молекул воды, включая реакцию молекулу, катион магния и аминокислотные остатки белка EF-Tu в радиусе примерно 20 Å от атома фосфора  $\gamma$ -фосфатной группы ГТФ. В квантовую подсистему были включены 36 атомов с учетом двух замыкающих групп  $\text{CH}_3$ . ММ-часть состояла из 1811 атомов, объединенных в 556 эффективных фрагментов. Значения энергии и силы в КМ-подсистеме рассчитывали методом Хартри–Фока с базисом LANL2DZdp и соответствующим псевдопотенциалом для атома фосфора. Для определения значений энергии и силы в ММ-подсистеме использовали параметры силового поля AMBER.

По результатам расчетов методом КМ/ММ в варианте конформационно-подвижных эффективных фрагментов [3, 4] определена равновесная геометрическая конфигурация фермент-субстратного комплекса (рис. 1).

Важно отметить, что реакционная молекула воды, обозначенная Wat на рис. 1, оптимальным способом ориентирована водородными связями с участием боковых цепей аминокислотных остатков His85 и Thr62 для нуклеофильной атаки на атом фосфора  $P_\gamma$  концевой фосфатной группы молекулы ГТФ. Подобная ориентация реакционной молекулы воды, а также расстояние от кислорода молекулы воды до  $P_\gamma$  (3,1 Å) характерны для диссоциативного механизма фермента-

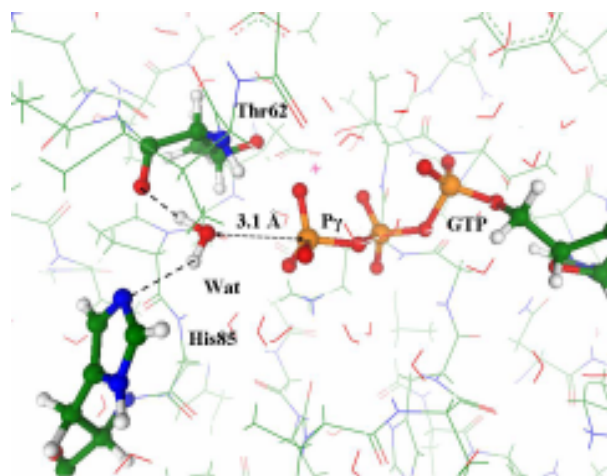


Рис. 1. Структура фермент-субстратного комплекса для гидролиза гуанозинтрифосфата в активном центре EF-Tu по данным расчетов методом КМ/ММ

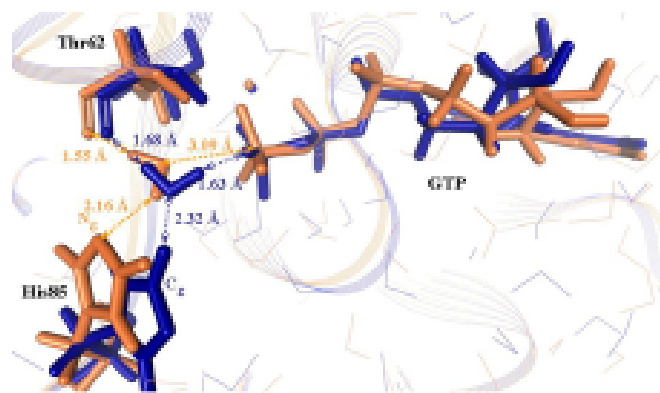


Рис. 2. Суперпозиция структур фермент-субстратного комплекса для гидролиза гуанозинтрифосфата в активном центре EF-Tu. Серым цветом выделены результаты расчетов методом КМ/ММ, черным – результаты молекулярно-динамического моделирования

тивного гидролиза молекул нуклеозидтрифосфатов. Согласно этому механизму, при разрыве связи  $P_\gamma-O_{\beta\gamma}$  под влиянием белкового окружения переходному состоянию отвечает плоская конфигурация группы  $P_\gamma O_3^-$ . Происходит нуклеофильная атака реакционной молекулы воды на атом фосфора  $P_\gamma$  с переносом протонов до образования молекулы неорганического фосфата. В ряде работ [5–7] было показано, что для подобного механизма характерны достаточно реалистичные активационные барьеры.

Для проверки эффективности методов классической молекулярной динамики со структурой фермент-субстратного комплекса (рис. 1) был проведен вычислительный эксперимент с использованием комплекса компьютерных программ молекулярной динамики NAMD2 [8] с силовым полем CHARMM. Ранее методом КМ/ММ была найдена геометрия фермент-субстратного комплекса и проведена оптимизация координат всех атомов модельной системы по минимуму энергии с данными параметрами силового поля. Затем от полученных положений атомов рассчитана молекулярно-динамическая траектория продолжительностью 4 нс, в конце которой снова осуществлена оптимизация координат всей системы по минимуму энергии. В результате получена новая структура фермент-субстратного комплекса, согласующаяся с потенциалами взаимодействия силового поля CHARMM.

На рис. 2 показана суперпозиция структур фермент-субстратного комплекса для гидролиза гуанозинтрифосфата в активном центре EF-Tu, найденных двумя методами. В целом структуры различаются не

столь заметно, что согласуется с общепринятыми представлениями об адекватности результатов структурных расчетов методом молекулярной динамики. Однако структура активного фермент-субстратного центра, полученная методом МД, не позволяет даже предположить возможную схему протекания реакции гидролиза, если анализировать ориентацию реакционной молекулы воды относительно  $\gamma$ -фосфатной группы молекулы ГТФ и бокового остатка His85. Очевидно, попытки моделировать нуклеофильную атаку

молекулы воды на  $\gamma$ -фосфатную группу ГТФ от данной конфигурации приведут к существенно завышенным активационным барьерам по сравнению с реакционным путем от структуры, показанной на рис. 1.

Таким образом, результаты данного моделирования показывают, что к предсказаниям метода молекулярной динамики с классическими силовыми полями следует относиться с осторожностью, даже если не рассматриваются стадии разрывов и образований химических связей.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 07-03-00060-а).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Варфоломеев С.Д.* Химическая энзимология. М., 2005.
2. *Daviter T., Wieden H.-J., Rodnina M.V.* // J. Mol. Biol. 2003. **332**. P. 689.
3. *Nemukhin A.V., Grigorenko B. L., Topol I. A., Burt S. K.* // J. Phys. Chem. A. 2002. **106**. P. 10663.
4. *Nemukhin A.V., Grigorenko B. L., Topol I. A., Burt S. K.* // J. Comput. Chem. 2003. **24**. P. 1410.
5. *Grigorenko B. L., Nemukhin A.V., Topol I. A., Cachau R. E., Burt S. K.* // Proteins: Struct. Func. Bioinf. 2005. **60**. P. 495.
6. *Grigorenko B. L., Nemukhin A.V., Shadrina M.S., Topol I. A., Burt S. K.* // Proteins: Struct. Func. Bioinf. 2007. **66**. P. 456.
7. *Grigorenko B. L., Rogov A.V., Topol I. A., Burt S. K., Martinez H.M., Nemukhin A.V.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. **104**. P. 7057.
8. *Kale L., Skeel R., Bhandarkar M. et al.* // J. Comp. Phys. 1999. **151**. P. 283.

Поступила в редакцию 26.06.08

## ENZYME-SUBSTRATE STRUCTURE FOR THE GUANOSINE TRIPHOSPHATE HYDROLYSIS BY THE ELONGATION FACTOR EF-Tu: COMPARISON OF THE RESULTS OF QUANTUM AND MOLECULAR MECHANICS AND MOLECULAR DYNAMICS

M.S. Shadrina, B.L. Grigorenko, A.V. Nemukhin

(Division of Physical Chemistry)

The results of two theoretical approaches for calculations of equilibrium geometry configurations of the enzyme-substrate complex for the guanosine triphosphate hydrolysis by the elongation factor EF-Tu are presented. The results of the combined quantum mechanics – molecular mechanics (QM/MM) and molecular dynamics simulations are compared. It is shown that the geometry structure of the reaction center obtained by the QM/MM method is consistent with the accepted reaction mechanism, while in the enzyme-substrate structure obtained by the molecular dynamics simulations with the CHARMM force field, the relative position of the nucleophilic water and histidine as a base does not correspond to the optimal arrangement of the reagents.